



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

مطالعه ارتباط کنترل ژنتیکی بیوسنتز اسید چرب دانه در براسیکا ناپوس در سطح

ژنوم

چکیده

اسیدهای چرب و ترکیب آنها در دانه ها، ارزش روغن را برای اهداف تغذیه ای یا صنعتی تعیین می کنند و همچنین بر جوانه زنی دانه و نیز ایجاد گیاهچه اثر می گذارند. برای درک بهتر مبانی ژنتیکی بیوسنتز اسیدهای چرب دانه در کلزا (براسیکا ناپوس L.)، ما یک مطالعه مرتبط در سطح ژنوم را با استفاده از 91205 پلیمورفیسم تک نوکلئوتید (SNP) اعمال نمودیم که توسط یک جمعیت آماری نگاشته با ژنوتیپ بدون چربی با وضوح بالا توسط توالی بندی (SkimGBS) مشخص می شود. ما خوشه ای از مکان های هندسی را در کروموزوم A05 مرتبط با اسیدهای چرب دانه اولئیک (روغنی) و Lin اولئیک (لینولئیک) شناسایی کردیم. منطقه ژنوم مشخص شده حاوی اورتولگ هایی از ژنهای *Arabidopsis thaliana* بود که نقش مهم آنها در تنظیم بیوسنتز اسید چرب دانه شناخته شده است، مانند تریستتاز چربی آسیل-ACP (FATB) B و Fatty Acid Desaturase (FAD5) دارد. این رویکرد ما را قادر می سازد تا ژن های کاری بالقوه تنظیم کننده ترکیب اسید چرب در این محصول مهم تولید کننده روغن را شناسایی نماییم و نشان می دهد که این رویکرد می تواند به عنوان یک ابزار قدرتمند برای تشریح صفات پیچیده برای برنامه های بهبود *B. napus* استفاده شود.

کلیدواژگان: براسیکا ناپوس ، ژنوتیپ بی چربی با توالی بندی (Skim GBS)، GWAS، بیوسنتز اسیدهای چرب،

کیفیت دانه

مقدمه

کلزا (براسیکا ناپوس L.) در حال حاضر دومین تولید کننده بزرگ روغن در جهان پس از سویا است (به ترتیب 70.9 و 314.5 میلیون تن، FAO1). سه اسید چرب اصلی (FAها) در روغن کلزا، اسید اولئیک FA تک-اشباع شده و دو اسید لینولئیک FAs چنداشباع شده و اسید لینولینیک هستند (Smooker et al., 2011). ارزش تغذیه ای بالای روغن

B. napus در مقایسه با سایر روغن های گیاهی به میزان بالای اسید اولئیک و همچنین به نسبت بهینه (2:1) FA های ضروری لینولئیک (امگا 6) و لینولنیک (امگا 3) نسبت داده می شود (Hu و همکاران، 2006). برای مقاصد صنعتی، پایداری حرارتی روغن *B. napus* با سطح پایین اسید لینولینیک تضمین می شود. درک مبانی ژنتیکی بیوسنتز اسید چرب در کلزا به منظور دستکاری محتوای آن اهمیت زیادی دارد.

فرایند بیوسنتز روغن در گونه های مدل و عضو دقیقاً مرتبط *Brassicaceae* به خوبی مشخص شده است؛ *Arabidopsis thaliana*. این فرایند پیچیده از یک عمل هماهنگ ژن های دخیل در بلوغ دانه، متابولیسم انرژی، اسید چرب و مسیرهای بیوسنتز تریاسیل گلیسرول (TAG) استفاده می کند (Baud and Lepiniec، 2010؛ Bates et al.، 2013). سنتز FA De Novo ها در داخل پلاستیدهای دانه اتفاق می افتد و تشکیل اسید پالمیتیک (16:0)، اسید استریک (18:0) و اسید اولئیک (18:1) را میسر می سازد. پس از تولید، آنها توسط دو دسته از آنزیم های تیواستراز ACP-آسیل (FAT) منتشر می شوند: FATA با نسبت بالاتری نسبت به 18:1-ACP و FATB با همبستگی بالاتر به 16:0-ACP (Bonaventure et al.، 2003). FA های پلاستیدال به ریشه اندوپلاسمی منتقل می شوند (ER) که در آنجا می توانند از طریق FAD2 و FAD3، آنزیم های کلیدی شناخته شده برای تولید FA های لینولئیک (18:2) و لینولنیک (18:3) که به صورت غیر اشباع شده تولید می شوند، تحت تغییرات اشباع زدایی قرار گیرند (Okuley et al.، 1994؛ Yang و همکاران، 2012). به موازات مسیر اشباع زدایی، FA ها می توانند توسط FAE1 به اسید اروسیک طویل شوند یا برای تولید TAG، یک شکل عمده روغن دانه در گیاهان به گلیسرول استری شوند (James et al.، 1995). اگر چه مسیرهای متابولیک برای سنتز بیوسنتز اسید چرب به خوبی شناخته شده اند، تنظیم ژنتیکی این مسیرها و از این رو ترکیب ترکیبات اسید چرب در دانه، هنوز درک نشده است.

B. napus (AACC، 2n = 38) از هیبریداسیون طبیعی بین *B. rapa* (AA، 2n = 20) و *B. oleracea* (CC، 2n = 18) در حدود 7500 سال پیش نشأت گرفت. اجداد تضاعف کروموزومی *B. napus* تحت تکثیر ژنتیکی قرار گرفتند که منجر به تشکیل خانواده های بزرگ ژن و توالی های تکراری افزونه شد. ژن های بیوسنتز روغن در *B. napus* تحت گسترش قرار گرفته اند که بیش از آن چیزی است که در سایر گیاهان دانه روغنی شناخته شده است (Chalhub et al.، 2014). Polyploidy و پیچیدگی ژنوم *B. napus*، انتقال محدود دانش پایه از *A. thaliana*

به بهبود محصول کلزا به عنوان شناسایی ژن های فردی کنترل کننده تغییرات طبیعی در این محصول به چالش کشیدن (Wells و همکاران، 2014).

تا به امروز، چندین مطالعه برای تشریح معماری ژنتیکی بیوسنتز اسیدهای چرب در محصولات روغن انجام شده است. مطالعات نگاشت مکان صفت کمی (QTL) در *B. rapa* (Basnet و همکاران، 2016)، *Glycine max* (Wang و همکاران، 2014)، *Jatropha curcas* و *B. napus*، شناسایی جایگاه هایی با اثر آلل کوچک تا بزرگ درگیر در بیوسنتز اسید چرب در دانه ها را میسر ساخت (Burns و همکاران، 2003؛ Hu و همکاران، 2006؛ Zhao و همکاران، 2008؛ Yan و همکاران، 2011؛ Wang و همکاران، 2015). ارتولوگ های کدگذار آنزیم های اصلی دخیل در بیوسنتز FA، مانند FAD2 و FAD3، در *B. napus* روی کروموزوم های A1، A5، C1، و C5 (Scheffler و همکاران، 1997؛ Schierholt و همکاران، 2000؛ Yang و همکاران، 2012) و A3، A4، A5، C3 و C4 (Hu و همکاران، 2006؛ Smooker و همکاران، 2011) نگاشت شده اند. به تازگی، یک رویکرد ژنتیکی سیستم که مطالعات بیان ژن را با نگاشته ژنتیکی QTL (eQTL) ترکیب نمود، منجر به شناسایی دیگر ژن های FAD (BrFAD5) و BrFAD7) شد که نقشی تعاملی با BrFAD2 در تنظیم FA های اولئیک و لینولئیک در *B. rapa* ایفا می کنند (ET Basnet al.، 2016). مطالعات تحلیل رونویسی در توسعه دانه های *Arabidopsis* و *B. napus* نشان داد که تنظیم بیوسنتز FA، پیچیده است و شامل ژن های مسئول برای تنظیم رونویسی، سوخت و ساز نشاسته، و همچنین سیگنالینگ هورمون اکسین و جاسمونات (Niu و همکاران، 2009؛ Mendes و همکاران، 2013؛ Chen و همکاران، 2015).

به تازگی، مطالعات ارتباط در گستره ژنوم (GWAS) به عنوان یک ابزار قدرتمند برای تشریح معماری ژنتیک صفات پیچیده در گونه های محصول (Edwards و همکاران، 2013) تکامل یافته است. پیشرفت ها در توالی بندی نسل بعدی (NGS) امکان شناسایی هزاران مکان نشانگر ژنتیکی را فراهم می کند که ارتباط آماری آنها با صفات مورد نظر را براساس عدم تعادل ارتباط میسر می کند (Davey et al.، 2011). ژنوتیپ مبتنی بر بی چربی بودن با توالی بندی (skimGBS) از توالی ژنوم کلی کم-پوشش (1-10x) برای ژنوتیپ با وضوح بالا استفاده می کند. ژنومیک خوانده شده از افراد والدین به ژنوم مرجع نگاشته می شوند و SNP ها پیش بینی می شوند. پس از آن خواندن ها از نسلی به همان

مرجع نگاشته می شوند و مقایسه با فایل SNP والدین، باعث فراخوانی SNP ها در نسلی از یک یا چند ژنوتایپ والدین می شود (Bayer et al., 2015). نشانگرهای وابسته به ژنتیک می تواند به خاطر صفت موردنظر یا در عدم تعادل ارتباط با یک منبع علمی، گاه به گاه باشند (Rafalski, 2010). تا به امروز، رویکردهای GWAS با استفاده از توالی بندی کلی ژنوم به محققان اجازه داده است تا به تشریح مقررات ژنتیکی صفات پیچیده مانند بیوسنتز روغن، غلظت کاروتنوئید و بازده در محصولات به خوبی مورد مطالعه گرفته از جمله ذرت و برنج بپردازند (Gao و همکاران، 2013؛ H Li و همکاران، 2013؛ Suwarno و همکاران، 2015). در کلزا، GWAS با استفاده از DartSeq و رویکردهای ژنوتیپ آرایه Brassica 60K SNP، شناسایی آلل های درگیر در تنظیم زمان گلدهی، و نیز صفات کیفیت دانه شامل جوانه زنی، قدرت و وزن دانه را میسر نمود (Li و همکاران، 2014؛ Hatzig و همکاران، 2015؛ Raman و همکاران، 2016).

هدف از مطالعه حاضر، انجام نگاشت ارتباط GWAS با استفاده از SkimGBS ژنوم کلی (Bayer et al., 2015) برای شناسایی تغییرات آللی بود که بر ترکیب اسید چرب در دانه های اولاد از خطوط هیپلوئید دابل شده 60 *B.napus* (DH) تاثیر می گذارد. این رویکرد جدید منجر به شناسایی یک کانون ژنومی ژنهای تنظیم کننده کاندیدای کروموزوم A05 از کلزای زمستانی شد.

مواد و روش ها

ماده گیاهی و شرایط رشد

یک جامعه آماری نگاشت *B. napus* DH از 60 خط، متشکل از خط عرضی بین خطوط فطری بازترکیب RIL324 به عنوان یک والد مونث، و RIL622 به عنوان والد مرد در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. دو پدر و مادر، نوع کانولای کلزای زمستانی را نشان می دهند و از نظر محتوای اسید چرب متفاوت هستند. آزمایش های فنوتیپی در سال 2014/2013 با استفاده از طراحی تجربی بلوک تصادفی انجام شدند. دانه های خطوط DH و والدین در مخلوط خاک استاندارد جوانه زدند و در محیط اتاق کنترل شده تا مرحله 3-4 برگ رشد کردند. برای امکان تسریع رشد گیاه در دماهای سرد، گیاهان به مدت 7 هفته در اتاق سرد (4 درجه سانتیگراد) قرار گرفتند. دو گیاه در هر خط DH در گلدان

های پلاستیکی پر از مخلوط خاک استاندارد کاشته شدند و در گلخانه تا زمان بلوغ رشد یافتند. خطوط DH انفرادی در چهار تکرار (چهار گیاه) رشد یافتند در حالی که خطوط والدین در 10 تکرار کشت شدند. دانه های بالغ خشک از هر یک از گیاه تکراری برداشت شدند و برای اندازه گیری های اسید چرب مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه گیری اسید چرب

روغن دانه برای ترکیب اسید چرب با استفاده از روش استرهای متیل اسید چرب کروماتوگراف گازی (GC FAME) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ترانس متیلاسیون لیپید های استخراج شده با 0.5 M KOH در متانول به مدت 15 دقیقه در دمای 70 درجه سانتی گراد انجام شد و سپس استخراج اسیدهای چرب به صورت استرهای متیل در هگزان صورت گرفت. ترکیب اسید چرب با یک کروماتوگرافی گاز Agilent 6890، ستون 30 متر DB25، 200 درجه سانتیگراد و آشکارساز یونیزاسیون شعله (Michalski) (FID، 2006) تعیین شد. تجزیه و تحلیل آماری صفات و تجزیه و تحلیل رگرسیون SNP های کاندید با استفاده از Genstat انجام شد.

ژنوتیپ کردن توسط توالی بندی (GBS): ژنوتیپ بی چربی

DNA ژنومی (gDNA) از گیاهان فردی درون خطوط با استفاده از یک روش استاندارد Doyle / CTAB (Doyle and Doyle 1987) استخراج شد. برای چک کردن، نمونه های کیفی DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و سپس اندازه گیری نمونه ها با استفاده از روش فلوتومتری Qubit تجسم شدند. کتابخانه های TruSeq Nano DNA برای تمام نمونه ها بر اساس دستورالعمل های سازنده (Illumina®) آماده شدند. اندازه ورود کتابخانه 500 bp بود. داده های GBS بی چربی انتهایی و جفت شده (150 bp) با استفاده از Hiseq 2500 در موسسه تحقیقاتی ژنوم استرالیا (AGRF) تولید شد.

SNPs و ژنوتیپ ها با استفاده از SGSautoSNP و خط لوله SkimGBS (Lorenco et al., 2012; Bayer et al., 2015) نامگذاری شدند. ژنوتیپ مبتنی بر بی چربی بودن با توالی بندی (skimGBS) از توالی کامل ژنوم (1-10x) کم-پوشش استفاده می کند و یک روش دو مرحله ای است که نیاز به دنباله ژنوم ارجاعی دارد، ژنومی که از افراد والدین و افراد جامعه آماری می خواند. در این مطالعه، قرائت ها استفاده از SOAPaligner / soap2 v2.21 (Li و

همکاران، 2009) به مرجع B. napus Darmor نگاشته می شوند (Chalhoub et al., 2014) (گزینه ها: اندازه را وارد کنید 0-1000، خواندن ها را به صورت غیر تکراری گزارش دهید). نگاشت بعدی خواندن نسل ها به یک مرجع مشابه و مقایسه آن با فایل SNP والدین، فراخوانی ژنوتایپ والدین را میسر می سازد. با توجه به پروتکل SGSautoSNP، داده های خواندن تحت تاثیر قرار نمی گیرند و یا فیلتر نمی شوند (Bayer et al., 2015).

مطالعه ارتباط در گستره ژنوم

ارتباط در گستره ژنوم با استفاده از GAPIT با تنظیمات استاندارد و PCA 2 انجام شد (Lipka et al., 2012). انتخاب ژنهای نامزد بر اساس زیر مجموعه ای از SNPs با کمترین مقادیر p بعد از اصلاح FDR بود (تنظیم GAPIT FDR استاندارد) بود. ژن ها در حدود 50 کیلو بایت در جریان بالا دست و پایین دست برای ارتباط با SNPs برای حاشیه نویسی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و ژن های دارای تنوع ژنتیکی بین والدین به عنوان ژن کاندیدای قابل قبول انتخاب شدند.

نگاشت SNPs در محیط سایبری

نگاشت فیزیکی SNPs به طور قابل توجهی مرتبط و حاشیه نویسی عملکردی ژن های پیش بینی شده با استفاده از این SNPs با استفاده از مرورگر ژنوم (<http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/>) B. napus (Chalhub et al., 2014) انجام شد. دایره المعارف ژن ها و ژنوم کیوتو (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>) و متابولیسم لیپید آسیل (<http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/pathways>) در این مطالعه برای شناسایی ژن هایی که در متابولیسم لیپید نقش دارند، پیش بینی تغییرات SNP و اثر آن با SnpEff با استفاده از حاشیه نویسی Darmor عمومی V5 (Cingolani et al., 2012) استفاده شد.

اعتبار SNP

به منظور اعتبارسنجی دقت پیش بینی SNP و SNPs بدون حس ارتباط فنوتیپی در سه ژن کاندیدای شناسایی شده از طریق GWAS یا نزدیک به SNP های مرتبط، PCR تقویت و توالی بندی شد. پرایمرهای PCR در کنار SNP

(جدول 4) با استفاده از نرم افزار PRIMER3 (Rozen and Skaletsky, 2000) طراحی شدند. تمام واکنش های PCR در حجم های واکنش 50 میکرولیتر حاوی 40 نانوگرم DNA قالب، 25 میکرو لیتر Phusion Hot Start II (Thermo Scientific) High Fidelity (استرالیا) و 0.5 میکروگرم پرایمر جلو و عقب انجام شدند. شرایط چرخه زنی شامل یک شروع اولیه داغ در دمای 98 درجه سانتیگراد برای 30 ثانیه بود؛ 33 چرخه اشباع زدایی در دمای 98 درجه سانتیگراد به مدت 10 ثانیه، بازپخت در 60-64 درجه سانتیگراد به مدت 20 ثانیه و تمدید در دمای 72 درجه سانتیگراد برای 30 ثانیه. واکنش به مدت 5 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد با چرخه تمدید نهایی به پایان رسید. به دنبال توصیه های سازنده، پاکسازی پس از-PCR قطعات PCR با استفاده از دانه های Ampure XP (Beckman Coulter)، انجام شد. قطعات PCR پاک شده به مرکز تحقیقاتی ژنوم استرالیا برای توالی بندی Sanger فرستاده شدند. داده های توالی بندی هرس شد و سپس با استفاده از Geneise R10 با استفاده از همبستگی جهانی با شکافهای آزاد (ماتریس هزینه: 93٪ شباهت (5.0 / -9026168) همتراز شد. توالی های هم ترازشده با توالی مرجع و جایگزین برای بررسی SNPs مقایسه شد.

اعتبارسنجی GWAS

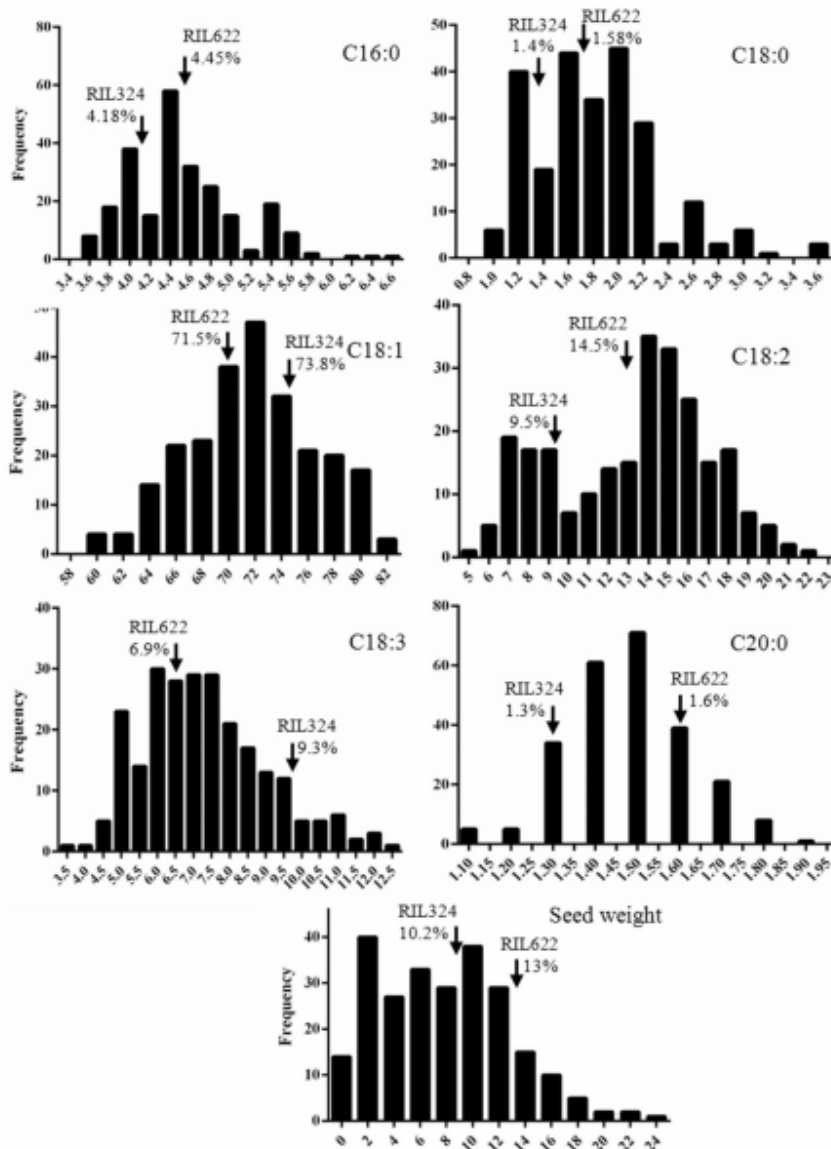
به منظور اعتبار سنجی مناطق مرتبط شناسایی شده از طریق تجزیه و تحلیل GWAS، نگاشت QTL انجام شد. SNPs جمعیت با استفاده از LD-kNNi (پول و همکاران، 2015) به صورتی که در TASSEL v5.2.30 پیاده سازی شدند (Glaubitz و همکاران، 2014) نسبت داده شدند. MSTMap (Wu و همکاران، 2008) برای ایجاد یک نقشه ژنتیکی با گزینه ها استفاده شد: Cut_off_p_value 2، no_map_size 2، no_map_dist 15، R Core Team) R v3.3.1 و (Broman et al. 2016) LOD و امتیازات LOD برای همه فنوتیپها با استفاده از نتایج MSTMap به عنوان موقعیت ها استفاده شدند (calc.genoprob) با گزینه گام = 1 و error.prob = 0.001، اسکنون با n.perm = 1000 برای محاسبه آستانه LOD و بدون n.perm برای محاسبه امتیازات LOD).

نتایج

همبستگی های تغییر فنوتیپی اسید های چرب در دانه ها / صفات

اسیده‌های چرب پالمیتیک C16:0، استاریک (C18:0)، اولئیک (C18:1)، لینولئیک (C18:2)، لینولینیک (C18:3) در محتوای کلی روغن و وزن دانه برای چهار تکرار در هر یک از خطوط DH 60 پانل *B. napus* اندازه گیری شدند (جدول 1، 2). جمعیت توزیع نرمال یا نزدیک به نرمال را برای اسیده‌های C16:0، C18:0، C18:1، C18:3 و C20:0 نمایش داد که پیچیدگی شبکه های ژنتیکی آنها را نشان می دهد (Wang and Ruan, 2012). C18:2 یک توزیع دو-نمایی را نشان داد که نشان می دهد ممکن است چند ژن وجود داشته باشند که اثرات نسبتاً بزرگی برای کنترل این فنوتیپ در بر داشته باشند (شکل 1). اختلافات معنی داری ($P < 0.001$) برای تمامی فنوتیپ ها در میان خطوط (داده های نشان داده نشده) و نیز طیف گسترده ای از تغییرات برای هر یک از اسید های چرب در کل غلظت روغن یافت شد. اسید چرب غالب، اولئیک (C18:1) با محتوای متغیر آن از 59 تا 82 درصد با میانگین 71.7 درصد و تغییرات ضریب 28/1 درصد بود. اسید اولئیک همبستگی ضعیفی با بازده دانه و C20:1 ($r = 0.33$ و 0.22) نشان داد و با اسیده‌های C18:2 و C18:3 همبستگی منفی داشت ($r = -0.9$ و -0.3). اسید لینولئیک (C18:2) دومین FA افزونه در گستره 5 تا 22 درصد (میانگین 13/1 درصد) بود و تغییرات ضریب 28/7 درصد بود.

شکل 1/ توزیع غلظت های اسید چرب در جامعه آماری نگاشت **RIL324xRIL622**. توزیع اسید چرب پالمیتیک (C16:0)، استریک (C18:0)، اولئیک (C18:1)، لینولئیک (C18:2)، لینولینیک (C18:3) و وزن دانه در خطوط جامعه آماری نگاشت *B.napus* RIL324xRIL622. اسیده‌های چرب به صورت درصد محتوای کلی روغن اندازه گیری شدند، مقادیر میانگین به صورت فرکانس با جمعیت نگاشت نشان داده می شوند. فلش ها نشان دهنده سطح اسید چرب در خطوط والدین RIL324 و RIL622 است.



جدول 1 میانگین ها و گستره ها برای اسیدهای چرب و وزن دانه در جامعه آماری نژاد RIL324xRIL622

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	Seed weight
Min ± SD ^a	3.8 ± 0.15	1 ± 0.05	59.3 ± 2.1	6.6 ± 0.3	4.1 ± 0.7	1.3 ± 0.1	0.98 ± 0.5
Max ± SD	5.9 ± 0.55	3.6 ± 0.63	80.6 ± 0.8	22.3 ± 0.9	12 ± 0.3	1.9 ± 0.05	23.34
Mean ± SD	4.56 ± 0.55	1.80 ± 0.51	71.71 ± 4.8	13.17 ± 3.7	7.29 ± 1.7	1.48 ± 0.15	7.77 ± 4.93
RIL324	4.18 ± 0.17	1.40 ± 0.25	73.87 ± 2.68	9.55 ± 2.76	9.33 ± 1.54	1.3 ± 0.18	9.1 ± 3.7
RIL622	4.45 ± 0.29	1.58 ± 0.16	71.15 ± 1.77	14.5 ± 1.09	6.9 ± 0.65	1.35 ± 0.05	13.00 ± 5.7
CV (%) ^b	11.96	28.15	6.78	28.79	23.65	9.89	63.44

^aSD (standard deviation), calculated based on the measure values of seeds from the four replicated experimental blocks. ^bcoefficient of variation which was estimated as the ratio of the standard deviation to the mean of all accessions.

SD a (انحراف معیار)، محاسبه شده بر اساس مقادیر معیار دانه ها از بلوک های آزمایشی تکراری. B ضریب تغییر که به عنوان نسبت انحراف معیار به میانگین تمام قابلیت های دسترسی تخمین زده شد.

جدول 2 ضریب همبستگی های پیرسون برای سهم درصد هر اسید چرب به محتوای کلی TAG.

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1	Seed weight
C16:0	1						
C18:0	-0.0162	1					
C18:1	-0.7091**	0.1661	1				
C18:2	0.6230**	-0.0299	-0.9477**	1			
C18:3	0.3351**	-0.6549**	-0.5833**	0.3220**	1		
C20:1	-0.1674	-0.3887**	0.2261**	-0.3879**	0.2957**	1	
Seed weight	-0.4926**	-0.1461	0.3395**	-0.2641**	-0.1634	-0.1546	1

Trait pairs affecting fatty acid composition in the RIL324xRIL622 mapping population. **significant at $P < 0.01$.

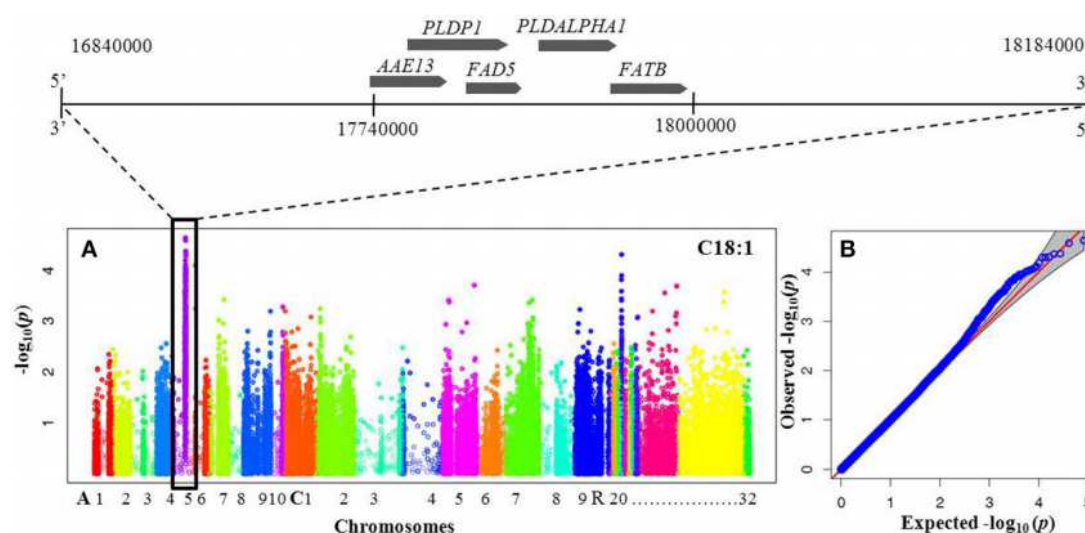
جفت های صفت تاثیرگذار بر ترکیب اسید چرب در جامعه آماری نگاشت **RIL324xRIL622** معنادار در $P < 0.01$ یک همبستگی ضعیف بین C18: 2 و وزن دانه ($r = -0.2$) یافت شد. سومین FA فراوان در روغن دانه *B. napus*؛ اسید لینولینیک در گستره 1/4 تا 12 درصد (میانگین 7.2) و تغییرات ضریب 23 متغیر بود. برای اکثر وزنه های FA و وزن دانه، تعدادی از خطوط DH دارای مقادیر بالاتر یا پایین FAS نسبت به دو والدین بودند که نشان دهنده جدایی متجاوز در این جمعیت بود.

نتایج ژنوتیپ کردن با استفاده از توالی (GBS)

خطوط DH فردی با پوشش متوسط 1.2x (محدوده 0.4x تا 2.6x) توالی بندی شدند. دو فرد والدین با پوشش 8.9x و 13.6x توالی بندی شدند. با استفاده از این خواندن ها، 91 SGSautoSNP، 205 SNPs بین دو نفر از والدین، از 84 (chrA08) تا 9867 (chrC02) SNPs در هر کروموزوم (به طور متوسط: 3778)، با SNP 19422 اضافی شناسایی شده در احتمالات جایگذاری نشده فراخوانی نمود. تعداد کم SNP شناسایی شده در کروموزوم A08 ناشی از عدم نگاشت خواندن ها برای 29.36٪ از کروموزوم در هر دو والدین است. خط لوله SkimGBS با استفاده از این SNPs، 2,009,854 ژنوتیپ در مجموع، به طور متوسط 29,556 (41.17٪) SNPs در هر فرد، از 11,714 تا 49,152 (68٪) (جدول تکمیلی 1) را فراخوانی نمود.

نگاشت ارتباطی در گستره ژنوم، ژنهای نامزد بالقوه تنظیم کننده ترکیب اسید چرب در دانه های کلزا را شناسایی می کند

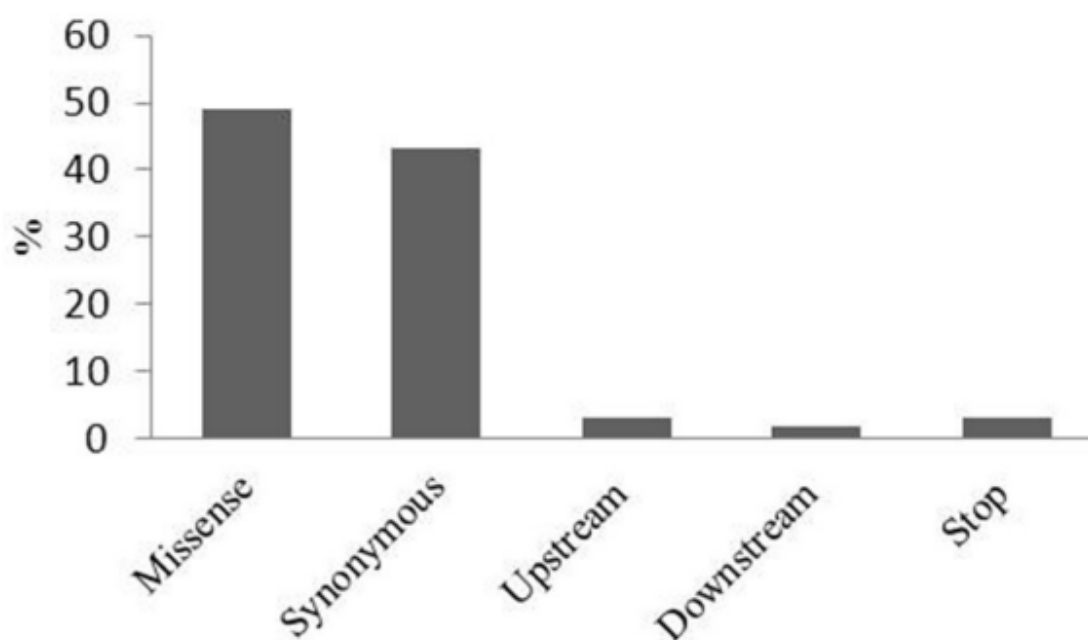
برای کشف معماری ژنتیکی ترکیب FA در دانه های *B. napus*، تجزیه و تحلیل ارتباط در گستره ژنوم بین FA و ژنوتیپ SNPs با استفاده از پانل DH 60 نگاشته از خطوط جمعیت انجام شد. تجزیه و تحلیل ارتباط با 91,205 SNPs، شناسایی یک پیک از SNP 34 مهم مرتبط با اسید اولئیک و لینولئیک واقع در بین 17.2 و 18.2 Mbp در کروموزوم A05 (شکل 2) را میسر ساخت. هیچ گونه ارتباط معناداری با هیچ یک از فنوتیپهای مورد آزمایش وجود نداشت.



شکل 2 نمودارهای چارک-چارک منهن حاصل از GWAS برای اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک. (A) نمودار منهن برای غلظت اسید چرب اولئیک (18:1) و لینولئیک (C18:2). محور X نشاندهنده موقعیت SNP در امتداد کروموزوم های نشان داده شده با رنگ های مختلف است: A1-A10, C1-C9 و کروموزوم های تصادفی 20-32 (مطابق با ژنوم مرجع *B. napus* Darmor v4.1 (<http://www.genoscope.cns.fr/brassicapapus/>)). محور Y، $\log_{10}(p)$ (مقدار P) است. پیک SNP مرتبط معنادار مشهود در کروموزوم A05. ناحیه ژنومیک احاطه کننده یک پیک GWA معنادار برای FA های C18:1 و C18:2، در امتداد بالا با ژن های کاندید شناخته شده دخیل در متابولیسم لیپید در جدول 3 و جدول 2 مکمل نشان داده شده اند. (B) نمودار چارک-چارک (Q-Q) مقادیر P برای اسید چرب اولئیک و اولئیک. محور Y، لگاریتم پایه 10 منفی مشاهده شده برای مقادیر P است و محور X،

لگاریتم 10 پایه منفی مشاهده شده مورد انتظار مقادیر P تحت این فرض است که مقادیر P از یک توزیع یکنواخت (0,1) پیروی می کنند.

نگاشت فیزیکی 34 SNPs بسیار مرتبط با FA های اولئیک و لینولئیک نشان داد که 16 تا از آنها در ژن های پیش بینی شده B. napus قرار داشتند در حالی که 18 تا در مناطق بدون ژن پیش بینی شده، عناصر قابل انتقال یا عناصر تکراری قرار داشتند (جدول 3). تجزیه و تحلیل اثر انواع SNP مرتبط نشان داد که 50٪ آنها، یک جهش غیرحسی را در ژن های پیش بینی شده نشان دادند، در حالیکه 37٪ از آنها مترادف بودند و هیچ تغییری در توالی اسید آمینه نشان ندادند. در مجموع 12٪ جهش ها، بالادست و پایین دست توالی کدگذاری یافت شد (شکل 3).



شکل 3. اثر GWAS مرتبط با انواع SNP روی ژن ها. این اثر (غیرحسی، مترادف، بالادست یک ژن، پایین دست یک ژن، توقف) برای GWAS مرتبط با انواع SNP روی ژن های پیش بینی شده ارائه شده به صورت یک درصد (٪) تجزیه و تحلیل عملکردی ژن با جهش های غیرحسی، شناسایی ژن های نامزد امیدوارکننده کننده با نقش شناخته شده قبلی در تنظیم اسید های چرب در ارگانیزم های مدل را میسر ساخت (جدول 3).

جدول 3/ SNPها و ژن های کاندید به طور معنادار مرتبط با اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک

حاشیه نویسی مقدار p-FDR تنظیم شده آل موقعیت نزدیکترین ژن ها ژن کاندید

Candidate gene	Nearest genes ^c	Position ^d	Allele	FDR adjusted p-value ^f	Annotation ^g
BnaA05g22550 ^a	BnaA05g22540, BnaA05g22610	17158994	C/T	0.415746	Cyclic Nucleotide binding factor 1 (CNBT1)
BnaA05g22710 ^a	BnaA05g22680, Bna05g22740	17234557	T/A	0.415746	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase1 (CIPK1)
EST <i>B. napus</i> ^a	Bna05g22950	17443201	A/G	0.415746	Nuclear fusion defective 2 (NFD2)
No gene prediction ^b	Bna05g23070	17479325	A/G	0.344113	Unknown
No gene prediction ^{a,b}	Bna05g23070	17490748	G/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Unknown
No gene prediction ^{a,b}	Bna05g23070, Bna05g23080	17491191	G/C	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Unknown
Repeats ^{a,b}	Bna05g23110 <i>PLDP1</i> (Li M. et al., 2013) Bna05g23210	17529591	C/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Repeats
Repeats ^{a,b}	Bna05g23110 <i>PLDP1</i> (Li M. et al., 2013) Bna05g23210	17539208	A/G	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Repeats
BnaA05g23370 ^{a,b}	Bna05g23360	17712452	A/C	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Small cysteine rich protein (<i>SCR-LIKE22</i>)
		17712458	G/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	
EST <i>B. napus</i> ^a	Bna05g23360	17729054	A/G	0.415746	Unknown
BnaA05g23430 ^a	Bna05g23360	17741099	C/G	0.415746	TRZ4, tRNAse
Bna05g23520 ^{a,b}	Bna05g23560	17777977	G/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Malonyl-CoA Synthase (<i>AAE13</i>)
EST <i>B. napus</i> ^a	Bna05g23360, Bna05g23560	17782780	A/G	0.415746	Unknown
EST <i>B. napus</i> ^{a,b}	Bna05g23670 <i>FAD5</i> , BnaA05g23680 <i>FAD5</i> (Heilmann et al., 2004)	17889752	A/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	UDP-Glycosyltransferase protein
Transposable element ^{a,b}	BnaA05g23720, BnaA05g23740 <i>PLDALPHA1</i>	17920979	C/G	0.415746 ^a 0.344113 ^b	TE
BnaA05g23770 ^{a,b}	BnaA05g23760, BnaA05g23790 <i>FATB</i> (Eronaventure et al., 2003)	17939130	T/G	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Fbox
BnaA05g23870 ^{a,b}	BnaA05g23830, BnaA05g23880	17986390	C/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Mitochondrial, glutaredoxin
BnaA05g23930 ^a	BnaA05g23880	18018284	G/C	0.415746	Pentatricopeptide repeat (TPP)-like
BnaA05g23960 ^{a,b}	BnaA05g23880	18027977	A/G	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Unknown
		18027976	A/G	0.415746 ^a 0.344113 ^b	
EST <i>B. napus</i> ^a	BnaA05g23880	18029252	A/G	0.415746	Unknown
EST <i>B. napus</i> ^{a,b}	BnaA05g23880	18043857	A/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Unknown
Repeats ^{a,b}	BnaA05g23880	18045729	A/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	Repeats
Repeats ^{a,b}	BnaA05g23880	18045779	A/T	0.415746 ^a 0.360659 ^b	Repeats
Transposable element ^{a,b}	BnaA05g23880	18046273	G/A	0.415746 ^a 0.344113 ^b	TE
EST <i>B. napus</i> ^{a,b}	BnaA05g23880	18057640	C/A	0.415746 ^a 0.344113 ^b	UDP-Glycosyltransferase protein

Candidate gene	Nearest genes ^c	Position ^d	Allele	FDR adjusted p-value ^f	Annotation ^g
EST <i>B. napus</i> ^{a,b}	BnaA05g23880	18047838	G/A	0.415746 ^a 0.344113 ^b	UDP-Glycosyltransferase protein
EST <i>B. napus</i> ^{a,b}	BnaA05g23880	18047852	C/T	0.415746 ^a 0.344113 ^b	UDP-Glycosyltransferase protein
BnaA05g24090 ^b	BnaA05g24100	18140199	C/G	0.344113	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
BnaA05g24230 ^{a,b}	BnaA05g24130	18182396 ^a	G/T	0.415746	Legume lectin family protein
		18182414 ^{a,b}	C/T	0.415746 0.344113	
		18182687 ^b	C/T	0.344113	

یکی از ژنهای امیدوار کننده، یک اورتولوگ از Malonyl-CoA Synthase (AAE13) شناخته شده ای است که در متابولیسم لیپید در *A. thaliana* با تغییرات نوکلئوتیدی G / T (UQSNP0001565) معرفی کننده جایگزینی اسید آمینه N526K دخیل هستند. تجزیه و تحلیل رگرسیون نشان داد که AAE13 با هر دو محتوای FA اولئیک و لینولئیک در دانه ها ($P < 0.001$) همبستگی دارد و تغییرات آنها را در 11/4 و 22/9 درصد بیان می کند. AAE13 نیز در سطح پایین با اسیدهای استریک و ایکوسنوئیک (8.8 و 8.6٪) ارتباط دارد. اعتبارسنجی SNP نشان داد که این یک پلیمورفیسم واقعی است (جدول 4).

یک ژن امیدوار کننده دوم که پروتئین سوپر خانواده تکرار-مانند Transducin / WD40 را کدگذاری می کند (BnaA05g24090) تغییرات C / G (UQSNP0001827) را نشان داد که باعث جایگزینی اسید آمینه L348V می شود.

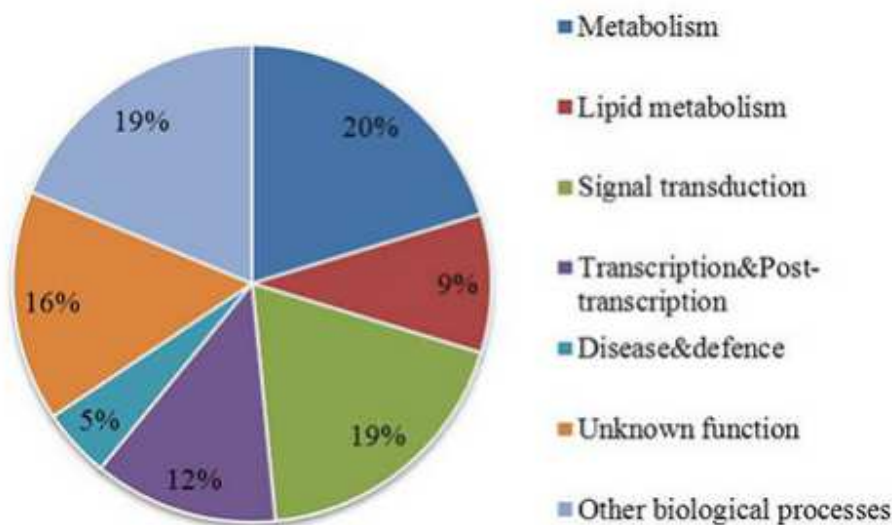
تجزیه و تحلیل رگرسیون با این ژن نیز ارتباط ضعیف با اسید استریک (7.9٪ از واریانس) و قوی با اولئیک (13/5٪ واریانس) و اسید لینولئیک (14.1٪) را نشان داد. یک جایگزین اسید آمینه R323T (UQSNP0001759) در اورتولوگ یک رگولاتور رونویسی ژن تکرار (BnaA05g23930)Pentatricopeptide (PPR) یافت شد. تجزیه و تحلیل رگرسیون با این ژن نیز ارتباط بسیار خاصی با اولئیک (13/5٪ واریانس) و اسید چرب لینولئیک (24/3٪ واریانس) را نشان داد.

جدول 4 اعتبارسنجی SNPها در ژن های کاندید

<i>B.napus</i> gene	Gene coordinates	Trait associated in GWAS	FDR adjusted p-value	Annotation	Functional category	SNPs	SNPs position (Darmor v4)	Allele	SNP effect	Confirmed	Indels	Type	Position
BnaA05g 23520	1777418-17781394	C18:1 C18:2	0.415746, 0.344113	AAE13	Lipid metabolism	UQSNP0001565	17777977	G/T	Missense variant	Confirmed	No		
BnaA05g 23670	17875337-17876795			FAD5	Lipid metabolism	UQSNP0001629	17876056	A/C	Synonymous variant	Amplified area did not cover SNP area	No		
						UQSNP0001630	17876071	T/C					
BnaA05g 23930	18017224-18019348	C18:1 C18:2	0.415746, 0.344113	PPR-like	Transcription	UQSNP0001759	18018284	G/C	Missense variant	Amplified area did not cover SNP area			
BnaA05g 24090	18138518-18143531		0.344113	WD40	Signal transduction	UQSNP0001827	18140199	C/G	Missense variant	Primers not specific			
BnaA05g 23740	17921857-17925521			PLD1LPHA1	Lipid metabolism	UQSNP0001673	17922271	C/T	Missense variant	Confirmed	Yes	AT (insertion)	17922566
						UQSNP0001674	17923336	C/A	Synonymous variant	Confirmed		AGATTTCGCTTTCTTTTAAAT (deletion)	17922836
						UQSNP0001675	17923519	T/G	Synonymous variant				
						UQSNP0001676	17923566	A/G	Synonymous variant				
						UQSNP0001677	17923726	A/G	Synonymous variant	Amplified area did not cover SNP area			
						UQSNP0001678	17924395	G/A	Synonymous variant				
						UQSNP0001679	17924465	G/T	Missense variant				
BnaA05g 23110	17520545-17528123			PLD1	Lipid metabolism	UQSNP0001374	17521025	A/G	Missense variant	Confirmed		TTTAATTCT (deletion)	175520708
												AATATATAAGGTTATGATC (insertion)	17520803
						UQSNP0001377	17521925	A/G	Synonymous variant	No-Amplified area did not cover SNP area			
						UQSNP0001383	17523040	T/C					
						UQSNP0001384	17525851	C/A					
						UQSNP0001386	17526546	A/G					

ژنهای مرتبط با GWAS ممکن است مستقیماً در تنظیم بلورهای اسید چرب دخالت نداشته باشند، بلکه ممکن است به پلی مورفیسم گاه به گاه در یک ژن نزدیک به آن مرتبط باشند. لیستی از تمام ژنهای نامزد شده در مجاورت SNPs مربوطه در جدول اضافی موجود است. حاشیه نویسی عملکردهای ژنهای مرتبط و آنهايي که در نزديکی فیزیکی آنها قرار دارند نشان داد که آنها در عملکردهای مختلف بیولوژیکی شامل متابولیسم، متابولیسم لیپید، انتقال سیگنال، رونویسی و برخی از عملکردهای خود ناشناخته هستند (شکل 4).

شکل 4. حاشیه نویسی عملکردی ژن ها در ناحیه ارتباط روی کروموزوم A05. حاشیه نویسی رده عملکردی ژن ها به طور معنادار مرتبط با اسید چرب اولئیک و لینولئیک در تحلیل GWAS و نزدیکترین ژن های حاشیه نویسی شده آنها که به صورت یک درصد نشان داده می شود.



بر اساس حاشیه نویسی عملکردی، مشخص شد که کدام ژن های کاندید ممکن است در تنظیم ترکیب FA در دانه ها مهم باشند. یکی از ژنهای کاندید قوی، BnaA05g23790D, 13 کیلو بایت پایین دست SNP UQSNP0001703 مرتبط واقع شده بود. این ژن، یک اورتولوگ (FATB) Ortho Acyl-ACP Thioesterase B را کدگذاری می کند، یک آنزیم عمده دخیل در تنظیم سنتز FA در دانه ها. این ژن، تنوع حضور/عدم حضور (PAV) را نشان داد که در خطوط والدین و فردی DH جامعه آماری نگاشت با استفاده از یک سنجش مبتنی بر PCR و ترکیبی متفاوت از آغازگرهای اختصاصی ژن FATB (داده ها نشان داده نشده است) تایید شد. تجزیه و تحلیل رگرسیون نشان داد که FATB با هر دو مقدار اسید چرب دانه اولئیک و لینولئیک ($P < 0.001$) مرتبط است و تغییرات آنها را به ترتیب در 16/8 و 30 درصد توضیح می دهد. برآورد ضریب رگرسیون برای اسید اولئیک -0.0375 بود، در حالی که برای اسید چرب لینولئیک، 0.0643 بود. این نشان می دهد که FATB، محتوای اسید چرب در دانه های جامعه آماری نگاشت را در تعامل با ژن های دیگر تنظیم می کند. یکی دیگر از ژنهای کاندید قوی (BnaA05g23670D), 13 کیلو بایت بالادست SNP UQSNP0001636 مرتبط بود و Palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol FAD5 Delta7-desaturase (FAD5) را کدگذاری می کند. تنوع A / C بین خطوط والدین جامعه آماری نگاشت در FAD5 یک کدون توقف را در اگزون دوم ژن معرفی می کند. جالب توجه است که خطوط والدین، هر گونه تغییر SNP در آنزیم های کلیدی FAD که حاوی اسید اولئیک و لینولئیک هستند، یعنی FAD2 و FAD3 را پناه نداد. دیگر

ژنهای نامزد که در عملکرد متابولیسم لیپید در گیاهان مدل نقش دارند، شامل BnaA05g23740D، اورتولوگ فسفولیپاز D آلفا 1 (PLDALPHA1)، 1.3 کیلوگرم پایین دست SNP UQSNP0001669 مرتبط بود و دارای 5 عبارات مترادف و دو جهش غیرحسی بود. به همین ترتیب، BnaA05g23110D، اورتولوگ فسفولیپاز D p1 (PLDP1) 3 کیلو بایت از UQSNP0001388 قرار گرفت و یک تغییر غیرحسی بین خطوط والدین را پناه داد. اعتبارسنجی پیش بینی SNP با استفاده از توالی بندی Sanger نیز یک جداسازی Indel را در خطوط والدین و فردی DH از جامعه آماری نگاشت در یک نوع هاپلو با SNPهای دیگر پیش بینی شده در این 2 ژن شناسایی کرد (جدول 4). تجزیه و تحلیل رگرسیون با انواع غیرحسی از هر دو ژن، ارتباط بسیار ضعیفی با فنوتیپهای مورد آزمایش در این مطالعه را نشان داد. داده های ژنتیکی و فنوتیپ مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل رگرسیون در جدول تکمیلی 4 نشان داده شده است.

به منظور اعتبارسنجی SNPهای پیش بینی شده GWAS، ما یک رویکرد نگاشت ژنتیکی و تجزیه و تحلیل QTL را نیز انجام دادیم. استناد با استفاده از LD-kNNi، تعداد آلل ها را از 2,272,337 به 4,030,644 آلل افزایش داد. MSTMap توانست 43,484 تا از 83,366 نشانگر را به گروه های پیوند با بیش از یک SNP جایگذاری کند. این گروه های ارتباطی از 420 تا 7,037 SNPs با میانگین 2888 تا، متغیر بودند. بالاترین 5 نمره LOD و موقعیت های آنها در cM و bp در جدول تکمیلی 5 نشان داده شده است و ارتباط در همان منطقه از کروموزوم A05 شناسایی شد که نتایج GWAS را تایید می کند، با این وجود با وضوح کمتر که ناشی از تعداد کمتر نشانگرهای نگاشته شده است.

در مجموع، رویکرد GWAS با استفاده از SkimGBS با وضوح بالا، شناسایی ژنهای نامزد موثر بر بر میزان اسید چرب دانه در B. napus را میسر نمود.

بحث

روغن دانه یکی از ذخایر مهم انرژی برای جوانه زنی دانه و استقرار گیاهچه در آینده است، در حالیکه برای اهداف صنعتی متفاوت، ترکیبات اسید چرب روغن از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. در این مطالعه، ترکیب ترکیبات

FAها در دانه های پروتئینی B. napus DH را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادیم که از تقابل بین دو خطوط والدین نوترکیب مشتق شده بود و SNPs در این خطوط را مشخص کردیم. رویکرد GWAS با استفاده از SkimGBS، ما را قادر به شناسایی ژن های نامزد تنظیم کننده مقادیر اسید چرب اولئیک و لینولئیک در دانه های B. napus نمود. ما تغییرات زیادی در پوشش SNP بین کروموزوم های خطوط والدین، از 84 در کروموزوم A08 تا 9867 در کروموزوم C02 مشاهده کردیم. در حالی که A08 هنوز کمترین تعداد SNPها را دارد، که به دلیل طول کوتاه این کروموزوم، شدیدتر به نظر می رسد. کروموزوم های A03، C03، و A05، درصدی بسیار شبیه آلل های یکسان بین خطوط والدین دارند (88٪ آلل ها در A08 بین پدر و مادرها یکسان هستند، 87٪ برای A03، 82٪ برای C03، و 77٪ برای A05) (جدول تکمیلی 3). به طور کلی دامنه آللهای یکسان در هر کروموزوم 48-88٪ است. چگالی کم نشانگر روی کروموزوم A08 ممکن است به علت عدم پوشش خواندن از دست رفته در طول 29.36٪ (556.7248 bp) از کروموزوم در هر دو خط والدین باشد. پوشش خواندن از دست رفته در 7025 منطقه کروموزوم A08 (میانگین طول 792 bp) مشاهده شد و می تواند ناشی از تفاوت ها بین ژنوم خطوط والدین و مرجع Darmor باشد که ما برای همترازی خواندن ها استفاده کردیم. همچنین مشاهده کردیم که در یکی از خطوط والدین، مجموعاً 786,414 bp (4.1٪ از کروموزوم A08) در مقایسه با پدر و مادر دیگر با خواندن ها پوشش داده نشد. خواندن های گمشده در یک بلوک واحد نبودند، بلکه در سراسر 38,737 bp از نواحی کوچکتر با طور متوسط 20 bp بودند. این دوباره می تواند به دلیل تفاوت ژنوم بین این خطوط باشد. چگالی کم SNP در A08 همچنین می تواند به دلیل سطح نسبتاً پایین تنوع ژنتیکی بین خطوط والدین باشد، زیرا آنها هر دو اسید اوروکیک کم و گلوکوزینولات کم (دو برابر صفر) را نشان می دهند. پرورش بلند و شدید کلزای دو برابر صفر منجر به یک حوزه ژن محدود شده است که تنوع ژنتیکی آنها را کاهش می دهد. کروموزوم A08 همچنین می تواند ناحیه ژنومی هویت-توسط-نسل را نشان دهد که به طور کارآمد توسط نوترکیبی در هنگام انتخاب مختل نشد (Browning and Browning, 2010).

پیک SNP های معنادار مرتبط برای محتوای اسید چرب اولئیک و لینولئیک در دانه ها در A05 کروموزوم شناسایی شد که با مطالعات ژنتیکی کمی قبلی گزارش دهنده QTL بزرگ برای اسیدهای چرب روی گروه ارتباط A05 متناظر است (Smooker و همکاران، 2011؛ Raman و همکاران، 2013؛ Wang و همکاران، 2015؛ Hu و همکاران،

2006). اخیراً یکپارچگی تجزیه و تحلیل QTL و فراوانی رونوشت (eQTL) در *B. rapa* نیز یک نقطه اتصال QTL را برای FAهای چنداشباع نشده روی کروموزوم A05 شناسایی نمود (Basnet et al., 2016). خطوط والدین در تجزیه و تحلیل ما، هیچ نسخه ژنتیکی FAD2 اشباع زدایی را پناه نداد، آنزیم کلیدی که محتوای اسید اولئیک در دانه های *B. napus* را تنظیم می کند (Hu و همکاران، 2006). بیوسنتز اسید چرب دانه، یک صفت پیچیده است که شامل اقدام هماهنگ چندین ژن می شود (Baud و Lepiniec، 2010)، بنابراین این احتمال وجود دارد که تنوع اسیدهای چرب در جامعه آماری نگاشت مورد مطالعه *B. napus* تحت حاکمیت شبکه ژنتیکی هنوز ناشناخته باشد. یکی از نامزدهای امیدوارکننده شناسایی شده در GWAS، BnaA05g23790D است که یک FATB می باشد. FATB، تنوع حضور / عدم حضور (PAV) بین خطوط والدین را نشان داد. این تغییرات با استفاده از تجزیه و تحلیل SNP سنتی شناسایی نمی شد، زیرا لازم است تا خواندن ها از هر دو خط والدین برای پیش بینی SNP نگاشته شوند. تیوسترازها، آنزیمهای کلیدی تنظیم کننده بیوسنتز اسیدهای چرب در دانه ها هستند، چون آنها در آزادسازی اسیدهای چرب آزاد از اسیل-ACP و صادرات آنها از پلاستیدها دخیل هستند (Jones و همکاران، 1995؛ Sun و همکاران، 2014). تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی طبیعی در بیوسنتز FA در *B. oleracea* نشان داد که فعالیت آنزیم FATB با QTL روی کروموزوم C5 مرتبط است (Barker و همکاران، 2007). به عنوان یک عامل اصلی تعیین کننده ترکیب اسید چرب در دانه ها، آنزیم های FAT نیز به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفت و در محصولات مختلف روغن، از جمله *Ricinus communis*، *Macadamia tetraphylla* و *Camelina sativa* مورد اصلاح قرار گرفت (Rodríguez-Rodríguez et al., 2011; Moreno-Pérez et al., 2010; Sánchez-García et al., 2015; Kim et al., 2014). یک جستجو از ژنوم مرجع *B. napus* Darmor با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن FATB مرتبط GWAS، سه هومولوگ را شناسایی نمود، که 100٪ هویت توالی نوکلئوتیدی را با FATB در کروموزوم (BnaA03g47660D، A03) (BnaC09g30860D، C09) و 99.87٪ هویت در کروموزوم A07 (BnaA07g08340D) شناسایی می کنند. جالب توجه است که ژن های شناسایی شده به عنوان آنزیم های FATA (حاشیه نویسی شدند. به احتمال زیاد، حاشیه نویسی BnaA05g23790D نادرست است، همانطور که یک جستجو از پایگاه Arabidopsis (TAIR) نیز نزدیکترین هویت توالی BnaA05g23790D با ژن FATA را تایید می کند. برای

جلوگیری از سردرگمی بیشتر، ما به حاشیه نویسی در دسترس عموم برای BnaA05g23790D پایبند هستیم و در اینجا ما آن را "FATB" می نامیم. ما هیچ تنوع ژنتیکی بین خطوط والدین در هر یک از سه نسخه از FATB را شناسایی نکردیم، که بتواند این مفهوم را برساند که نسخه BnaA05g23790D از FATB، یک نسخه کاربردی است که مقادیر اسید چرب در دانه های *B. napus* را تنظیم می کند. تجزیه و تحلیل رگرسیون FATB، ارتباط این ژن با اسیدهای چرب اولئیک و اولنیک را تأیید می کند، اما همچنین نشان می دهد که این تنها ژن مسئول تغییرات اسیدهای چرب نیست، بلکه به احتمال زیاد با سایر ژن های تنظیم کننده FA ارتباط برقرار می کند. جالب است که خط والدین با فقدان نسخه FATB حاوی اسید اولئیک و بالاترین مقدار اسید لینولئیک در مقایسه با خطوط DH با همان ژنوتیپ است. خطوط DH با عدم حضور FATB، یک فنوتیپ مخالف را نشان داد که می توانست نشان دهنده این باشد که درجه تحرک بالا در خطوط نسلی وجود دارد. در برنامه پیش از پرورش، خطوط نسلی حاصل از تقابل های مختلف با استفاده از خط والدین RIL324 (محتوای بالاتر اولئیک و محتوای پایین لینولئیک FA) ثبات فنوتیپی را حتی در نسل F5 نشان نداد (ارتباطات شخصی، Plant Breeding and Acclimatization Institute-National Research Institute) این نشان می دهد که تغییرات در اسیدهای الئین و لینولئیک در این ژنوتیپ ها، به جای یک ژن تک و همچنین تعامل زیست محیطی ممکن، توسط بسیاری از ژن ها در این فنوتیپ ها تنظیم می شو. تحقیقات بیشتری برای درک نقش و نحوه عملکرد FATB در تنظیم اسیدهای چرب در دانه های *B. napus* ضروری است.

برای اعتبار سنجی نتایج GWAS با استفاده از داده های skimGBS، تجزیه و تحلیل QTL را انجام دادیم. تجزیه و تحلیل نگاشت QTL، همان منطقه ژنومی را شناسایی کرد، اما وضوح پایین تر بود. روش SkimGBS از داده های پوشش کم برای GWAS مناسب استفاده می کند، اما در تجزیه و تحلیل QTL، خواندن های از دست رفته منجر به نشانگرهای کمتر می شود که می توانند نگاشته شوند که به طور قابل توجهی بر روی وضوح تاثیر می گذارد. رویکرد QTL، زمانی مناسب تر است که هیچ توالی ژنوم مرجع در دسترس نیست، در حالی که GWAS نیز می تواند زمانی مورد استفاده قرار گیرد که یک ژنوم مرجع وجود دارد و مارکرهای مبتنی بر دنباله در دسترس هستند.

تجزیه و تحلیل GWAS ما به شناسایی چندین ژن کاندیدای امیدوار کننده دیگر منجر شد که یکی از آن ها یک اورتولوگ FAD5 (BnaA05g23670D) است که متعلق به گروه ضداشباع های اسید چرب است. نقش FAD5 به تجمع یکی از فراوان ترین FA های موجود در برگ ها، به نام 7-Hexadeca:3Δ7,10-Trienoic acid-13 (13,10) منسوب است و نقش آن در بیوسنتز روغن دانه هنوز به خوبی درک نشده است (Heilmann et al., 2004). تجزیه و تحلیل بیان ژن بیوسنتز چربی نشان داد که FAD5 در دانه های *B. napus* نسبت به برگ ها کمتر است (Chen و همکاران، 2015). در *B. rapa*، بیان FAD5 با بیان FAD2 و FAD7 در دانه ها و بیان QTL های آنها (eQTLs) همراه با QTLs برای اسید اولئیک، اسید لینولئیک و دیگر اسیدهای چرب در دانه ها (Basnet et al., 2016) مرتبط بود. این یافته ها، همراه با مطالعات ما، یک نقش تعاملی ناشناخته FAD5 را در تنظیم ترکیب FA دانه در *B. napus* نشان می دهد. مشخص شد که سایر ژنهای کاندید مرتبط با محتوای FA اولئیک و لینولئیک در این مطالعه شامل ژن اورتولوگ پیش بینی شده AAE13 (Acyl Activating, Malonyl-CoA Synthetase) برای تشکیل کاتالیزوری Malonyl-CoA شناخته شده است، یک پیش ساز سنتز اسید چرب و طویل کننده (Chen et al., 2011; Guan and Nikolau, 2016) می شود. تحقیق ما، امکان شناسایی ژن مرتبط با اسید لینولئیک را فراهم نمود که پروتئین سوپر خانواده تکراری-مانند / Transducin WD40 (BnaA05g24090) را کدگذاری می کند. در مطالعه ژنتیکی نگاشت *B. rapa*، WD-40 به عنوان یک ژن کاندید در تنظیم اسید اولئیک (Basnet et al., 2016) گزارش شد و نقش آن در تجمع TAG در *Drosophila melanogaster* شناخته شده است (Häder et al., 2003). ژن دیگر شناسایی شده در تجزیه و تحلیل GWAS ما، یک ژن رگولاتور (PPR) Pentatricopeptide (BnaA05g23930) در گیاهان را کدگذاری می کند. دخیل بودن ژن های PPR در بیان ژن پلاستید مشخص شده است و برای توسعه کلروپلاست نرمال مورد نیاز هستند. پلاستیدها، محل بیوسنتز متابولیت های اساسی از جمله اسیدهای چرب هستند (Pyo و همکاران، 2013). جهش در این ژن باعث اختلال در رشد مناسب دانه و تولید فنوتیپ های کشنده گیاهچه می شود (Gutierrez-Marcos et al., 2007).

نتیجه گیری

GWAS با استفاده از رویکرد NGS SkimGBS به ما اجازه داد تا یک منطقه ژنومی مرتبط با محتوای اسید اولئیک و لینولئیک را نشان دهد که بینشی در مورد معماری ژنتیکی پیچیده بیوسنتز اسید های چرب در دانه های *B. napus* را ارائه می دهد. حضور ژن ها در نقطه اتصال ارتباط شناخته شده برای تنظیم بیوسنتز اسید های چرب، معتبر بودن این روش را تایید می کند. کارهای آینده شامل تجزیه و تحلیل ارتباط ژنهای کاندید با محتوای FA اولئیک و لینولئیک می باشد. درک مکانیسم عمل و پلی مورفیسم های علیت از این که ژن ها درک بهتر از نقش این ژن ها را در تنظیم بیوسنتز اسید های چرب در دانه این محصول مهم روغن تولید می کنند.

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی